

菊花萜类物质代谢关键酶 FAS 基因的克隆及功能分析

胡昊^{1,2}, 杨婷³, 高莉萍³, Maarten A. Jongsma³, 王彩云^{1,2,*}

(¹ 华中农业大学园艺植物生物学教育部重点实验室, 武汉 430070; ² 农业农村部华中都市农业重点实验室, 武汉 430070; ³ Wageningen Plant Research, Wageningen University and Research, P.O. Box 619, 6700 AP, Wageningen, The Netherlands)

摘要: 以菊花模式品种 (*Chrysanthemum morifolium* ‘1581’) 为材料, 通过固相微萃取 (SPME) 结合 GC-MS 气相质谱联用技术分析其叶片及子房中次生代谢挥发物成分及相对含量, 发现萜类代谢物在挥发物中占主要地位。基于转录组测序结果, 从萜类合成酶基因 *FDS* 基因家族中克隆得到 1 个菊花法尼醇合成酶 (Farnesol synthase, CmFAS) 基因。其 ORF 全长 1 197 bp, 编码氨基酸 398 个, 5'端具有质体定位信号肽。进化树分析表明 CmFAS 属于菊科植物 *FDS* 家族, 与除虫菊及艾蒿中的单萜合成酶 *CDS* 亲缘关系最近。多重比对及氨基酸序列分析证实, CmFAS 具备该基因家族典型的类异戊二烯代谢催化活性保守结构域。基因时空表达分析显示 CmFAS 在菊花幼嫩组织中表达量最高, 其次是子房与成熟叶片, 但均低于菊花中另外 2 个 *FDS* 基因。通过大肠杆菌原核表达与酶学反应证实, CmFAS 可以利用类异戊二烯代谢路径上游底物二甲基丙烯焦磷酸 (DMAPP) 和异戊烯基焦磷酸 (IPP) 以及菊基焦磷酸 (CPP) 分别产生法尼醇和菊基醇, 同时具备了异戊烯基转移酶以及萜类合成酶的双重活性。法尼醇合成酶 CmFAS 是菊花中鉴定的第 1 个质体定位的倍半萜合成酶。

关键词: 菊花; 法尼醇合成酶; 萜类化合物; 基因表达; 原核表达

中图分类号: S 682.1⁺¹

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2021) 02-0313-12

Cloning and Characterization of Key Synthase FAS Gene Involved in Terpenoids Pathway of *Chrysanthemum morifolium*

HU Hao^{1,2}, YANG Ting³, GAO Liping³, Maarten A. Jongsma³, and WANG Caiyun^{1,2,*}

(¹ Key Laboratory for Biology of Horticultural Plants, Ministry of Education, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; ² Key Laboratory of Urban Agriculture in Central China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, P. R. China, Wuhan 430070, China; ³ Wageningen Plant Research, Wageningen University and Research, P. O. Box 619, 6700 AP, Wageningen, The Netherlands)

Abstract: The secondary metabolite composition and relative abundance in leaves and ovaries of the *Chrysanthemum morifolium* model cultivar ‘1581’ were analyzed by SPME extraction and GC-MS analysis. The terpenoids represented the dominant group of volatiles. Based on conserved sequences

收稿日期: 2020-09-22; **修回日期:** 2020-12-07

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31902051); 中国博士后科学基金项目 (2018M640720); 中央高校基本科研业务费专项 (2662019FW016); 国家重点研发计划项目 (2019YFD1001500)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: wangcy@mail.hzau.edu.cn)

FDS-like genes identified in a transcriptome database derived from chrysanthemum, a farnesol synthase gene (*CmFAS*) was cloned with an 1 197 bp open reading frame (ORF), encoding 398 amino acids and putatively located in the plastids. Phylogenetic analysis showed that *CmFAS* belongs to the *FDS* gene family in Asteraceae and has higher sequence similarity with the monoterpene *CDS* genes of pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium*) and *Artemisia*. Multiple alignment of *FDS* proteins of several different plant species demonstrated that *CmFAS* had the five typical conserved regions of chain elongation prenyltransferases. The gene expression of *CmFAS* was the highest in young leaves and lower in ovaries and mature leaves. The expression level of *CmFAS* was lower than that of *CmFDS1* and *CmFDS2* in chrysanthemum. By enzyme assay, it showed that *CmFAS* not only catalyzed DMAPP and IPP to farnesol but also converted CPP to chrysanthemol. *CmFAS* is a bifunctional enzyme generating both monoterpene and sesquiterpene products. *CmFAS* is the first sesquiterpene synthase located in plastids of chrysanthemum.

Keywords: *Chrysanthemum*; farnesol synthase; terpenoids; gene expression; prokaryotic expression

源于植物类异戊二烯代谢途径的萜类化合物，是植物气味、脂质或激素信号等物质的重要组成部分 (Loza-Tavera, 1999)，其种类繁多，结构各异，骨架具有以 C5 为基数递增的线性碳氢链或复杂的环状结构。在工业生产领域包括香水、化妆品、芳香剂、药物及杀虫剂等产品制备上具有重要的经济价值 (Holstein & Hohl, 2003)。植物萜类化合物不但为植物生长发育提供重要的激素、营养等，同时还是植物与外界环境之间的重要联系物质。萜类化合物根据所包含异戊二烯单位数的不同可分为单萜、倍半萜、二萜、三萜和四萜等，其中研究最为广泛的是单萜和倍半萜。它们主要以挥发态的形式参与植物的生理活动，如香气的组成释放，昆虫传粉引诱以及害虫的化学防御等 (Halbert et al., 2009; Yu et al., 2012; Pickett et al., 2013; 李晓颖 等, 2019)。二者的合成主要依赖于异戊烯基转移酶与萜类合成酶，分别以 DMAPP 和 IPP 或 GPP、FPP 作为直接前体 (Schillmiller et al., 2009)。前人从拟南芥基因组序列分析中发现了 40 多种萜类合成酶基因，它们在基因结构与系统发育上相似，但是由于进化过程中基因连续重复或氨基酸替换，导致酶的结构和功能发生了改变。有些可催化单一底物产生多个萜类产物 (Steele et al., 1998)，有些具备同时合成单萜和倍半萜的双功能酶活性 (Davidovich-Rikanati et al., 2008; Hu et al., 2018)，因此研究这些酶功能的可塑性对不同植物的进化具有重要作用。

FDS (Farnesyl diphosphate synthase) 是植物类异戊二烯途径中一类重要的倍半萜萜类合成酶，其主要负责催化倍半萜的合成。*FDS* 基因家族编码的酶使得植物代谢合成中的类异戊二烯分子存在广泛的结构变异。目前，已在药用、香料和观赏等多种植物 (Chen et al., 2003) 中克隆得到 *FDS* 基因，且认为在拟南芥、水稻、菊花、青蒿、银胶菊和白羽扇豆等植物中至少存在 2 个或以上的 *FPP* 合成酶异构体 (Hemmerlin et al., 2003)。Hemmerlin 等 (2003) 从青蒿中分别克隆到 *FDS-1*、*FDS-2* 和 *FDS-5* 的 cDNA 全长，对其基因功能研究表明 *FDS-1* 基因主要合成大量的抗病虫类萜类物质，而 *FDS-5* 基因则主要将 IPP 或 DMAPP 进行环化形成菊基焦磷酸 (CPP)。通常 *FDS* 基因家族成员都包含有 5 个具备链式延伸的类异戊二烯催化保守位点，其中含有 2 个天冬氨酸富集基序 (DDXXD)，作为结合金属离子的活性位点，对催化底物具有重要的识别作用 (Sacchetti & Poulter, 1997)。因此，*FDS* 基因家族不同成员的表达与功能随着物种和发育阶段的不同而有所不同。

菊花是集观赏、药用、茶用为一体的中国传统名花 (Luo et al., 2018)，其体内的次生代谢产物

种类极其丰富。研究菊花体内倍半萜代谢产物的种类、分子合成与释放对于其药用、茶用品质以及抗虫性的改善具有重要意义。本研究中以菊花品种‘1581’为材料,以倍半萜类物质为研究重点,通过转录组测序分析,总共比对到 8 个倍半萜合成酶 FDS 同源基因,而其中 1 个基因与单萜合成酶基因具有更高的相似性,因此,从菊花中克隆得到这个基因的完整序列,对其进行了生物学分析,比较其在不同组织中与其他 FDS 基因的表达模式,并对蛋白催化功能进行了鉴定,根据其催化产物,将其命名为菊花 *CmFAS* 基因,通过了解 *CmFAS* 的特性,以期从分子水平研究菊花中不同倍半萜类物质代谢奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

以实验室保存的菊花‘1581’(*Chrysanthemum morifolium* ‘1581’)作为试验材料。所选品种来源于荷兰瓦赫宁根大学,现种植于华中农业大学园艺林学学院花卉基地。取植株茎尖于春季进行扦插繁殖,2 个月后,取幼嫩叶片用于 DNA 提取。于花期选取长势一致的植株,采集幼嫩叶片、成熟叶片以及子房,液氮冷冻后超低温冰箱保存,生物学重复 3 次。

1.2 *CmFAS* 的克隆和全长序列的获得

采用改良的 Trizol 法对冻存样品提取总 RNA,利用 MicroElute RNA clean-up Kit 纯化试剂盒(OMEGA)纯化总 RNA。凝胶电泳检测完整性后利用 PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa)合成 cDNA。以课题组前期 454-测序结果为数据库,筛选 FDS 家族同源基因序列,以拼接测序的 *CmFAS* 预测 ORF 序列为模板设计引物(表 1),扩增基因的整个 ORF 区域。PCR 体系 50 μ L, 1 μ L cDNA 模板, 10 mmol \cdot L⁻¹ dNTPs Mix 1 μ L, 上、下游引物(10 μ mol \cdot L⁻¹)各 2.5 μ L, 50 \times Advantage[®] 2 Polymerase Mix(Clontech)1 μ L, 10 \times Advantage[®] 2 PCR Buffer 5 μ L, 补水至 50 μ L。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 退火温度 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 结束后,用 DNA 凝胶回收试剂盒(全式金)回收 DNA 片段,并重组连接至 pEASYTM-T1 载体,转化大肠杆菌,挑取阳性单克隆,送公司测序。

表 1 菊花 *CmFAS* 基因克隆、载体构建及表达所用引物

Table 1 Primers for cloning, construction of vector and gene expression of *CmFAS* in *Chrysanthemum*

引物用途 Primer use	引物名称 Primer name	引物序列 (5' - 3') Primer sequence
基因 ORF 克隆 Cloning the full-length ORF	CmFAS LF CmFAS LR	ATGGCAITCTGTAATAGTCTCGTAGG TTACTTAIGTCCTTTGTATATCTTTCCG
原核表达载体构建 For prokaryotic expression vector	CmFAS_Asc I CmFAS_Not I	TATAGGCGCGCCTGACTACGACAATGAGCAGCGA TATAGCGGCCGCTTACTTATGTCCCTTGTATATCTTTCC
基因表达分析 Gene expression	CmFAS F CmFAS R CmActin F CmActin R	CCGAGGTTGGTATGACTGCTG TCGTTGAATAGGTCCACTAGATGC CCTCTTAATCCTAAGGCTAATCAG CCAGGAATCCAGCACAAATACC

1.3 *CmFAS* 生物信息分析

所获序列在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 真核生物基因数据库上进行 Blast

比对, 利用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>) 进行 *CmFAS* 序列开放阅读框的预测, 利用 SignalP 4.1Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 分析蛋白质的信号肽。结合 NCBI 的 protein blast 以及菊科其他植物 *FDS* 基因作为参考进行蛋白序列保守结构域分析, 利用 ClustalW 软件进行氨基酸序列多重比对, 并利用 MEGA-X 软件进行 Bootstrap 检测, Neighbor-Joining 法构建系统进化树。

1.4 *CmFAS* 表达分析

分别提取冻存的幼嫩叶片、成熟叶片和子房材料的 RNA, 反转录成 cDNA, 以基因序列设计特异引物 (表 1), 利用 Real-time 荧光实时定量 PCR 分析 *CmFAS* 以及 *CmFDS1* 和 *CmFDS2* 在不同组织中的表达模式。*CmFDS1* 和 *CmFDS2* 序列信息来自于前期转录组数据。以成熟叶片中 *CmFAS* 的表达量作为 1。选择 *CmActin* 作为内参基因。试验设 3 次生物学重复。参考 SYBR *Premix Ex Taq II* 荧光定量试剂盒 (TaKaRa) 说明书配制体系, 试验操作在 Applied Biosystems 7500 Fast Real-time PCR System 上进行, 反应结束后计算并比较扩增获得的 CT 值, 目的基因的相对表达量利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析 ($\Delta CT = CT_{\text{target gene}} - CT_{\text{reference gene}}$)。

1.5 *CmFAS* 原核表达载体的构建及目的蛋白的纯化

蛋白体外表达采用 pRSET-A 载体, 根据多克隆位点区域选择合适的酶切位点。为提高蛋白可溶性, *CmoFAS* 基因序列选择去除 5'端 40 个氨基酸的质体定位肽以外的全长序列为模板, 设计分别包含 *Pst I* 和 *HindIII* 两个酶切位点的特异引物扩增 *CmoFAS* 片段, 将载体与扩增片段进行双酶切, 并用 T4 连接酶连接到 pRSET-A 载体, 转化大肠杆菌, 挑取阳性克隆测序鉴定。

将测序正确的 pRSET-A-*CmoFAS* 载体质粒热激转化 BL21AL 蛋白表达感受态, 接种于附加 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Amp 的 LB 固体培养基上, 37°C 过夜培养。挑取平板上阳性单菌落于 10 mL 附加 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Amp 与 1% *L-arabinose* 的 LB 液体培养基, 于 37°C , $250 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床中培养过夜, 取过夜培养的菌液按 1:50 比例扩大培养至 OD_{600} 为 $0.6 \sim 0.8$, 加入 $50 \mu\text{L}$ 20% *L-arabinose* 诱导剂, 18°C , $250 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 诱导 18 h 后收集菌液。离心去除上清液, 向菌块加入 1 mL lysis 缓冲液及 $10 \mu\text{L}$ $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶菌酶悬浮沉淀, 冰育 30 min。超声波破碎细胞 60 s, 间隔 10 s 于冰上孵育 10 s。 4°C , $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液, 利用 Ni-NTA agarose 蛋白纯化试剂盒 (Qiagen) 进行蛋白纯化。将纯化所得蛋白加入等体积 $2 \times \text{SDS}$ 上样缓冲液, 95°C 加热 3 min, 离心 3 min, 上样 SDS-PAGE 胶, 分析蛋白诱导表达结果。

1.6 *CmFAS* 酶催化反应及 GC - MS 检测鉴定

将纯化蛋白利用 PD-10 去盐柱 (GE Healthcare) 进行脱盐及 MOPSO 溶液置换, 添加不同的反应底物组合进行酶催化反应。反应体系为 MOPSO 溶液 $400 \mu\text{L}$, 纯化蛋白 $100 \mu\text{L}$, 催化底物 ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DMAPP + $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPP 或 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CPP) 共 $30 \mu\text{L}$, 最后在溶液上方覆盖 $500 \mu\text{L}$ 戊烷以吸附反应过程中所产生的挥发性产物。 30°C 振荡孵育 24 h。孵育结束后, 加入 $500 \mu\text{L}$ 乙酸乙酯提取挥发物, 涡旋振荡 1 min, $4\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 分离有机相和水相。吸取上层有机相, 经含有 1 cm 高的玻璃丝和 1 cm 高无水硫酸钠玻璃过滤柱脱水处理。氮气浓缩至 $200 \mu\text{L}$ 以备进行 GC - MS 检测。

GC - MS 检测系统为 DSQ II 气相色谱-质谱联用仪连接 Agilent 6890 Network detector (Thermo Fisher Scientific, USA)。色谱条件为 HP-5MS 石英毛细管色谱柱 ($30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm I.D.}$, $0.25 \mu\text{m}$ 膜

厚度, Agilent 公司, 美国)。进样体积, 1 μL , 进样口温度: 250 $^{\circ}\text{C}$, 起始温度 40 $^{\circ}\text{C}$, 保持 3 min, 再以 10 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, 升至 280 $^{\circ}\text{C}$, 保持 2 min。高纯度氦气 (99.999%) 为载气, 流速 10 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 不分流模式。质谱条件为电离方式 EI, 电子能量 70 eV, 离子源温度为 150 $^{\circ}\text{C}$, 扫描范围 45 ~ 450 amu。检测结果采用 Xcalibur (Thermo Electron Corporation) 软件分析, 结合 NIST (版本 2.2, 2014) 谱库检索以及标准物质的质谱图进行物质鉴定。

1.7 次生代谢挥发物收集与检测

于花期选取长势一致的菊花 ‘1581’ 植株新鲜叶片, 子房分别取 0.5 g 量于 10 mL 萃取瓶中, 立即用聚四氟乙烯 (Teflon) 硅胶复合隔垫将其密封在 20 mL 螺口玻璃样品瓶中, 平衡 10 min, 常温下采用萃取头 (50/30 μm DVB/Carboxen/PDMS, Supelco 公司, 美国) 顶空萃取 40 min。萃取结束后将纤维头插入气相色谱进样口解析 3 min。同时吸附采用瓶空气作为空白对照, 设 3 次生物学重复。

GC - MS 检测系统同上, 数据分析采用质谱检索与保留指数相结合的二维定性方法。将 GC - MS 分析所得质谱图与 NIST (2005) 谱库检索比对标准物质的质谱图, 之后进一步利用科瓦茨保留指数 (Kovats' Retention Indices, KI) 确认, 以 1% 作为检索尺度。样品挥发性物质的保留指数由相同升温程序下正构烷烃标准样品 ($\text{C}_8 \sim \text{C}_{30}$) 计算得到 (van den Dool & Kratz, 1963)。同时, 根据总离子流色谱峰的峰面积归一化法计算各组分占有所有挥发性物质的百分比, 以此得到各挥发性物质的相对含量值。

2 结果与分析

2.1 菊花 ‘1581’ 次生代谢挥发物分析与鉴定

利用顶空固相微萃取方法萃取菊花幼嫩叶片与子房的挥发性物质, 并结合气相色谱-质谱联用技术分析鉴定所萃取到的挥发性化合物。总共检测到了 67 种物质, 叶片与子房分别鉴定到 46 种和 50 种。其中种类最多的为萜烯类, 其次是醇类、酯类、酮类和酚类 (图 1)。

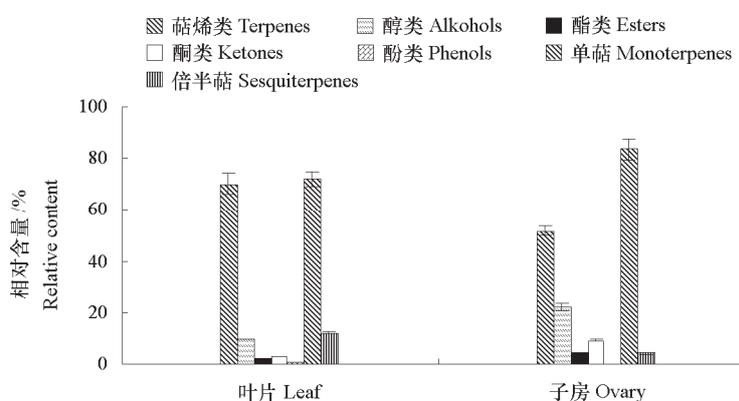


图 1 菊花 ‘1581’ 不同部位代谢产物成分及其相对含量

Fig. 1 The relative abundance of secondary metabolites in different tissues of *Chrysanthemum* ‘1581’

萜类物质主要以单萜类化合物与倍半萜类化合物为主，叶片中单萜类化合物 29 种，占总流出物的 71.89%，倍半萜类化合物 15 种，占总流出物的 11.96%。子房中单萜类化合物 36 种，占总流出物的 83.57%，倍半萜类化合物 12 种，占总流出物的 4.25%。叶片中相对含量较高的物质是 α -蒎烯(26.35%)，其次是 α -侧柏烯(10.90%)、 β -月桂烯(10.58%)、桉叶油醇(6.37%)。子房中相对含量较高的物质有桉叶油醇(18.79%)、 α -蒎烯(16.14%)、繖柳酮(7.05%)和 2,4-(10)-侧柏二烯(6.45%) (表 1)。可见，萜类化合物是菊花释放的主要挥发性物质，但不同组织所释放的含量存在显著差异。

2.2 CmFAS cDNA 全长克隆与序列特征

根据转录组数据所获得的全长片段设计引物，以 DNA 为模板，克隆得到 *CmFAS* 基因的全长序列。*CmFAS* 基因包含 13 个外显子和 12 个内含子，其中编码区序列长度为 1 197 bp，编码氨基酸 398 个，蛋白大小约 39 kD。理论等电点 (pI) 为 4.98。其编码序列具备 FDS 基因家族的 5 个类异戊二烯催化活性保守位点，可归类为 FDS 合成酶家族成员。利用 SignalP 4.1 Server 分析可知，该基因具备一段质体定位信号肽，推测其催化作用部位为质体。

2.3 CmFAS 蛋白同源性比对与分析

利用 MEGA-X 对菊花、青蒿、拟南芥等物种的 22 个 FDS 家族成员的蛋白氨基酸序列构建进化树 (图 2)。

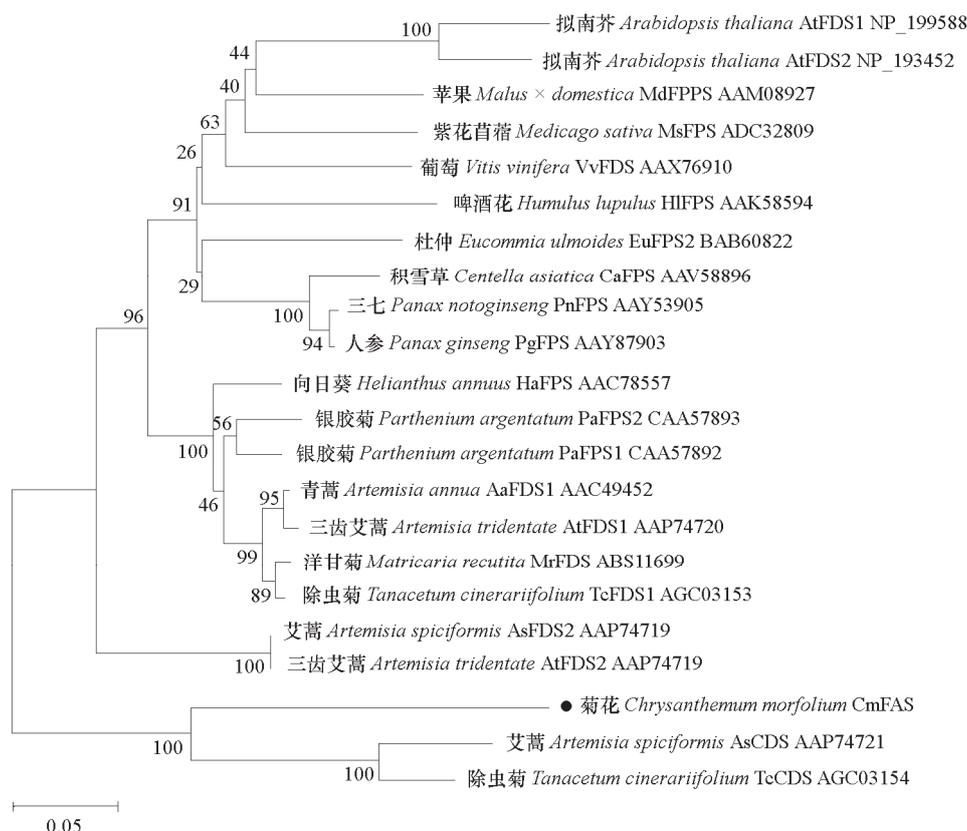


图 2 CmFAS 与其他植物 FDS 家族进化树分析

分支上的数值表示自展值，标尺表示分支长度。

Fig. 2 The phylogenetic analysis of CmFAS and FDS family with other plants

The number in the tree represents boots value. The scale bar represents branch length.

菊科植物的 FDS 亲缘关系较近, 聚集在一起, 而模式植物拟南芥及其他科植物聚集在另一类。特别是, 大多数 FDS 倍半萜合成酶成员聚类在一起, 而本研究中克隆到的菊花的 CmFAS 却与艾蒿 (AAP74721) AsCDS 和除虫菊 (AGC03154) TcCDS 单萜合成酶的亲缘关系最近。

挑选 9 个成员进一步多重比对分析 (图 3), CmFAS 与其他成员的氨基酸序列相对保守, 其中与除虫菊 TcCDS (AGC03154) 相似性最高, 且二者在 5'端均具备一段质体定位信号肽。同时, CmFAS 也具备和其他物质一致的 5 个类异戊二烯产物催化活性保守位点, 其中在保守域 II 和 V 中均有 1 个天冬氨酸富集基序 D (N) DXXD, 起到引导底物催化的特殊作用。以上结果表明, 本研究中克隆到的 CmFAS 基因属于 FDS 基因家族的典型成员, 但是从亲缘关系及相似性分析判断它可能与传统的倍半萜合成酶具备不同的功能特性。

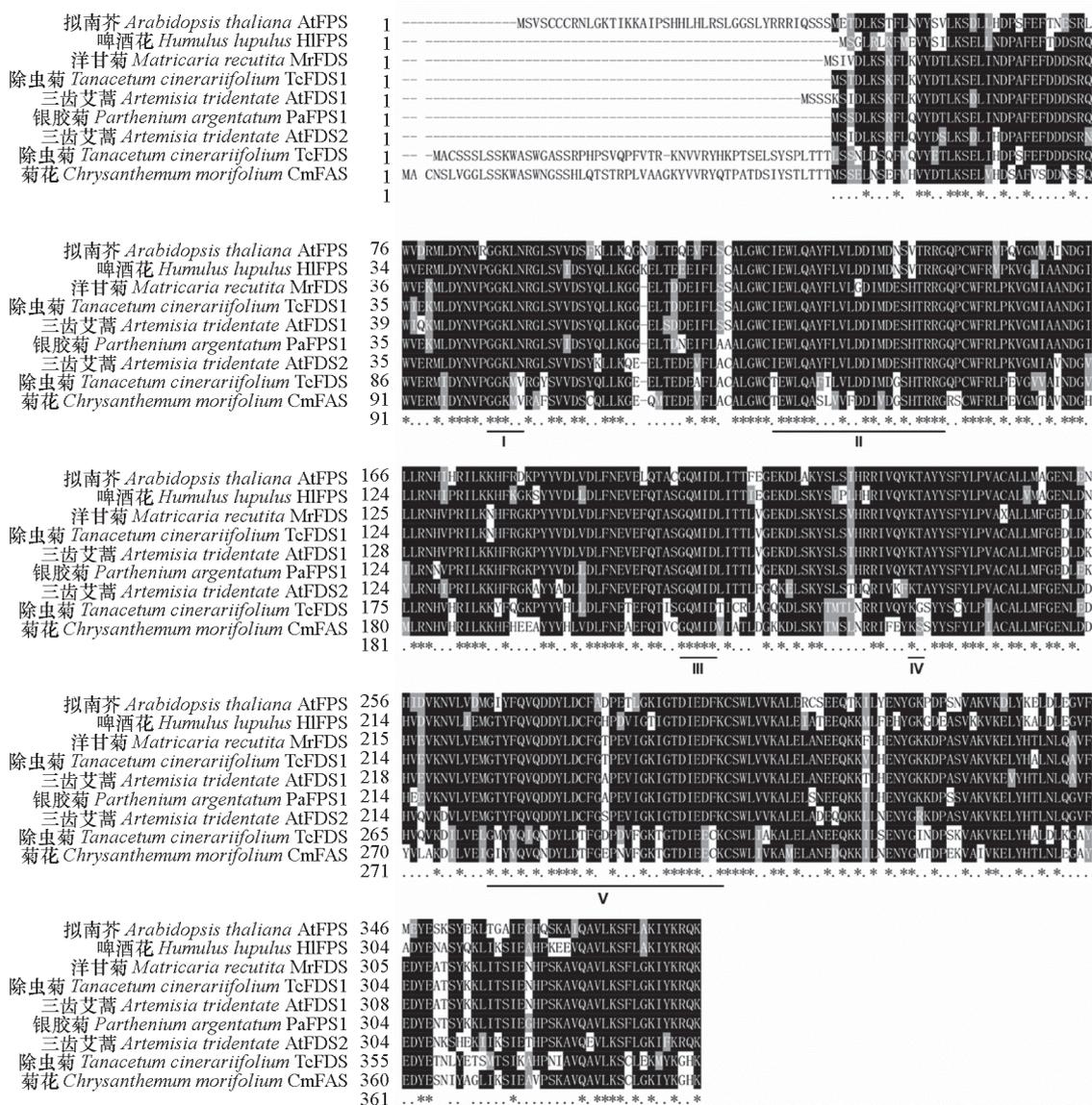


图 3 CmFAS 与其他植物 FDS 家族同源蛋白的多重比对

I ~ V 下划线: 5 个异戊烯基转移酶催化活性保守区域。

Fig. 3 Protein alignment of CmFAS with FDS proteins from other plant species

I - V underline: Five conserved regions in chain elongation prenyltransferases.

2.4 CmFAS 时空表达模式分析

由于 *CmFAS* 基因属于 *FDS* 基因家族, 因此, 通过荧光定量 PCR 对 *CmFAS* 以及另外两个基因 *CmFDS1*、*CmFDS2* 在菊花不同组织中的表达水平进行了检测和比较。以 *CmFAS* 在成熟叶片中的表达量为对照值, 结果 (图 4) 显示, 菊花 *CmFDS1* 和 *CmFDS2* 基因在不同组织间的相对表达量无显著差异, 但均高于 *CmFAS*, 尤其在幼嫩叶片中, 分别达到 16 倍和 10 倍。*CmFAS* 的表达量在菊花各组织中均较低, 而在不同组织间, *CmFAS* 在幼嫩叶片中的表达量最高, 显著高于成熟叶片 3.4 倍, 其次是子房。以上结果表明 *CmFAS* 更倾向于在幼叶和子房中催化产物合成。

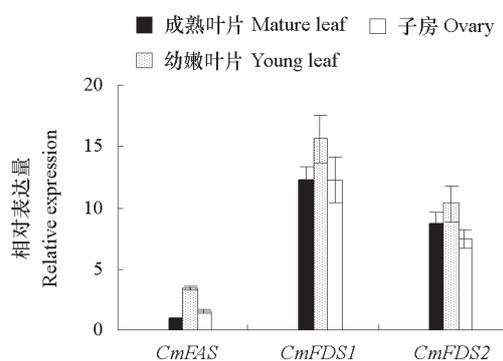


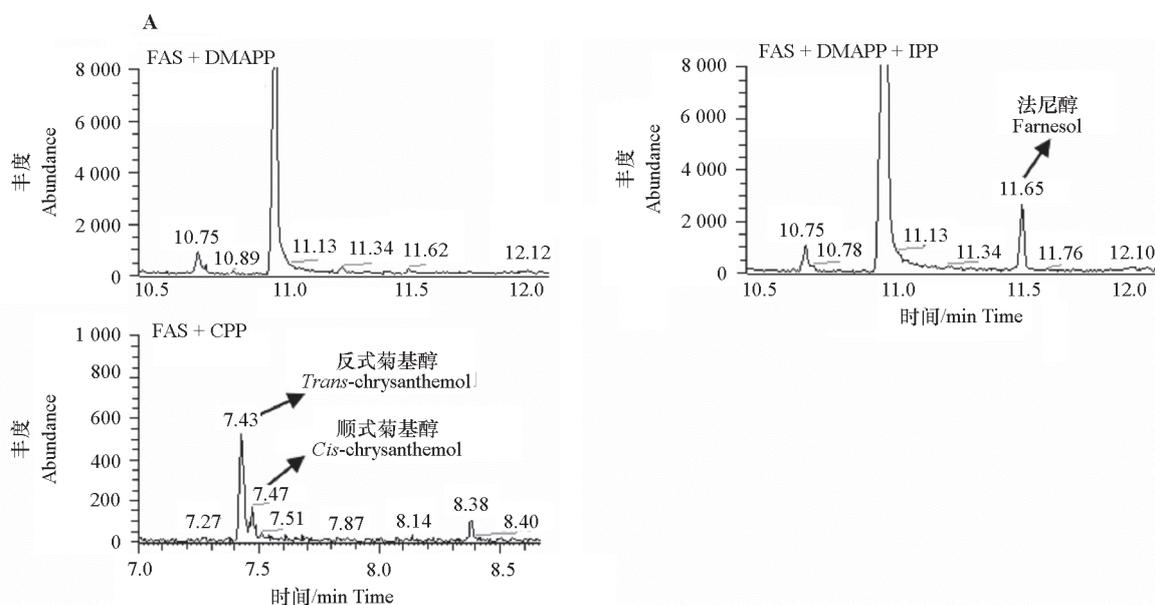
图 4 菊花 ‘1581’ *CmFAS* 及其同源基因在不同组织及发育时期的表达水平

Fig. 4 Expression levels of *CmFAS* and other homologous genes in different tissues and development stages of *Chrysanthemum* ‘1581’
 $P < 0.05$.

2.5 CmFAS 体外表达产物检测与功能分析

为了研究 *CmFAS* 的催化功能, 将 *CmFAS* 蛋白进行表达纯化并与不同的催化底物进行酶反应。为了得到纯化的 *CmFAS* 蛋白, 对不同的表达载体与菌株进行了比较, 最终发现将 *CmFAS* 构建到 pRSET-A 载体并利用 BL21AI 表达菌株可以成功诱导出目的蛋白。在进行酶反应前, 利用 PD-10 柱对纯化蛋白进行去盐及 MOPSP 缓冲液置换, 可促进酶反应的进行。

酶反应结果表明, 在仅有类异戊二烯前体 DMAPP 底物存在的情况下, *CmFAS* 不能催化产生菊基醇以及法尼醇, 而当提供类异戊二烯前体底物 DMAPP 和 IPP 时, *CmFAS* 可以催化 DMAPP 和 IPP 形成中间产物法尼基焦磷酸 FPP 并最终生成倍半萜化合物法尼醇 (图 5, A), 表明 *CmFAS* 具备异戊烯基转移酶的催化活性。



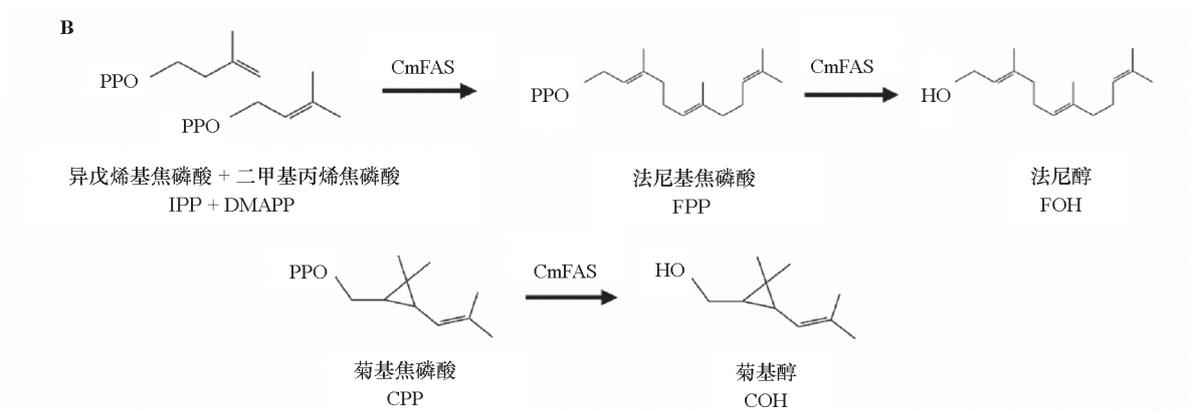


图 5 CmFAS 蛋白的功能分析

A: CmFAS 表达蛋白与不同底物的 GC - MS 产物检测; B: CmFAS 催化萜类合成的代谢途径。

Fig. 5 The catalytic function of CmFAS

A: GC - MS detection of product of CmFAS protein with different substrates.

B: Schematic pathway of synthesis of terpenoids catalyzed by CmFAS.

由于菊花 CmFAS 与除虫菊中的 TcCDS 具有氨基酸序列高度相似性, 尝试添加 TcCDS 催化的前体底物 CPP 进行酶反应, 结果 (图 5, B) 发现, 菊花 CmFAS 同样具备催化菊基焦磷酸 CPP 产生菊基醇 Chrysanthemol (COH) 的萜类合成酶活性。因此, CmFAS 是同时具备异戊烯基转移酶和萜类合成酶双重活性的蛋白酶, 将其命名为法尼醇合成酶 FAS, 推测其参与了菊花类异戊二烯代谢途径中位于质体发生的赤藓糖醇磷酸代谢途径 (MEP) (图 6)。

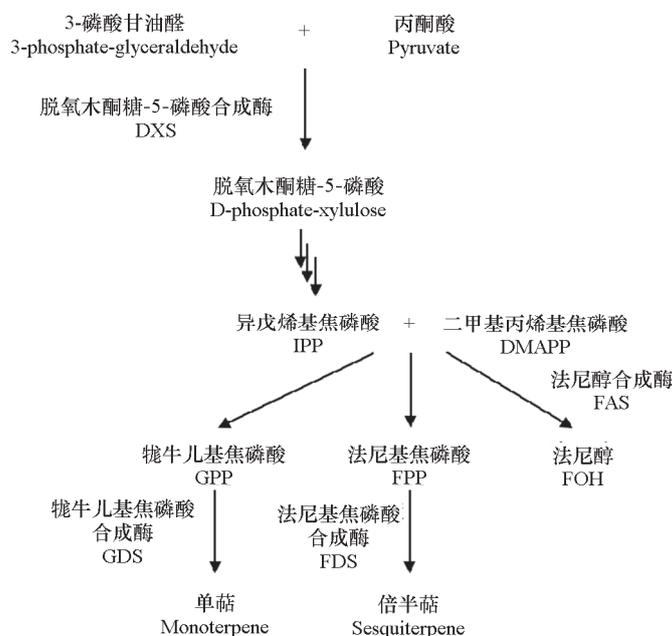


图 6 菊花 CmFAS 酶参与赤藓糖醇磷酸代谢途径推测图

Fig. 6 The putative schematic of CmFAS involved in MEP pathway

3 讨论

FDS 是倍半萜合成初始阶段重要的关键限速酶，主要用于合成植物次生代谢倍半萜物质，由一个大的基因家族组成，目前已经从以菊科植物为代表的几十种植物中分离出来（岳跃冲和范燕萍，2011）。不同植物来源的 *FDS* 编码的氨基酸序列相对保守。本研究中通过前期转录组测定得到 8 个 *FDS* 基因家族相似序列，克隆得到菊花 *CmFAS* 基因。*CmFAS* 与菊科植物其他的 *FDS* 基因家族同源性较高，同样具备 5 个类异戊二烯代谢催化保守区域，但是从亲缘关系上看它更接近于除虫菊以及青蒿中的 *CDS* 基因。在催化产物方面，*CmFAS* 倾向于催化类异戊二烯底物 DMAPP 和 IPP 生成下游倍半萜产物法尼醇 FOH，但同样也能催化 *CDS* 基因的底物 CPP 产生相应的水解产物菊基醇 COH，因此 *CmFAS* 属于一类既能合成倍半萜又能合成单萜的双重酶蛋白。前人报道有些萜类合成酶也具备双功能酶活性，比如罗勒倍半萜合成酶 - α - 姜烯合成酶在 GPP 底物下也能够产生单萜 GOH（Davidovich-Rikanati et al., 2008）；还有草莓和金鱼草等物种也有过双功能酶报道（Aharoni et al., 2004; Nagegowda et al., 2008）。氨基酸序列比对表明，*CmFAS* 基因在两次基因复制的进化过程中在 *FDS* 编码氨基酸序列负责底物结合和催化功能相关的第 4 个和第 5 个保守域发生了 3 个特殊的突变，分别为 T201→S244, F239→Y281 和 D243→N285。根据这些氨基酸化学属性的不同，可以分为保守型和非保守型（Hughes et al., 1990; Zhang et al., 2002; Pupko et al., 2003）。其中 F239→Y281 和 D243→N285 为非保守型突变，其发生很容易使得氨基酸进化出新的催化功能（Pupko et al., 2003）。F239 位点刚好参与负责 *FDS* 与亲核底物 IPP 的结合（Hosfield et al., 2004; Rondeau et al., 2006）。因此前人认为 F239→Y281 的突变可能会使得 *FDS* 失去催化底物 IPP 的功能（Liu et al., 2012）。而体外表达结果发现 *CmFAS* 蛋白仍然能催化 DMAPP 和 IPP 产生直链单萜法尼醇 FOH，说明 F239 位点并不是决定酶利用 IPP 与否的唯一标准。而 N285 位点（NDXXD）主要负责与金属离子的结合，若基序发生突变则会导致酶催化活性的下降或产生异常的产物（Wang & Ohnuma, 1999），Yang 等（2014）证实除虫菊 *TcCDS* 中正是 D243→N285 的氨基酸突变导致了 *TcCDS* 的类异戊烯基转移酶和萜类合成酶的双重催化功能的产生。因此，这个氨基酸突变也很有可能是 *CmFAS* 蛋白具备倍半萜和单萜双重合成酶活性的重要原因。进化过程中的定向选择会引发碱基替换突变，即便是 1 个单独氨基酸改变的定向选择都有可能改变基因催化底物从而推动基因家族的功能分歧（Barkman et al., 2007），因此，正是这些高概率定向选择位点的突变可能导致了 *CmFAS* 在从 *FDS* 基因家族进化过程中催化底物类型的改变。

萜类代谢合成发生在植物的不同亚细胞部位，包括细胞质、质体或者线粒体，且源于两个独立的代谢途径（MVA 与 MEP）（Mcgarvey & Croteau, 1995）。通常认为 FPP 和倍半萜合成于细胞质，单萜合成于质体（Tholl, 2006）。但是更多的研究发现，前体底物 IPP 和 DMAPP 在不同的组织空间能相互交换，特别是由质体向细胞质进行运输（Hemmerlin et al., 2003; Phillips et al., 2008）。而且，用于合成单萜的萜类合成酶，如果 N 端缺乏质体定位肽，同样也能在细胞质中合成单萜（Aharoni et al., 2003），例如罗勒中的 α - 姜烯（ α -zingiberene）合成酶就可以在番茄细胞质中表达（Davidovich-Rikanati et al., 2008）。同样，在一些野生番茄种中也鉴定了 1 条新的位于叶绿体中的倍半萜代谢途径，在 *Solanum habrochaites* 中，短链 zFPS 合成酶可以利用质体中的 IPP 和 DMAPP 生成相应的 Z,Z-FPP 从而合成下游倍半萜物质（Sallaud et al., 2009）。在野生番茄中，1 个腺体特异性的倍半萜合成酶 ShZIS 同样也能在质体中产生倍半萜 7 - 姜烯（Bleeker et al., 2012）。从氨基酸序列水平上看，这些倍半萜合成酶与传统的细胞质倍半萜合成酶相差较大，而与质体中单萜合成酶

序列更相似。本研究中所克隆的 *CmFAS* 正符合以上的特征, 这也是在菊花中首次鉴定到的质体倍半萜合成酶。

萜类化合物是植物次生代谢物中类型最丰富的家族, 在菊花不同组织的代谢产物成分中, 单萜和倍半萜类物质占绝大多数比例, 而单萜和倍半萜作为挥发态物质, 通常是菊花气味释放的主要来源, 同时也能够协助植物与环境进行相互间联系 (Pickett et al., 2013), 包括吸引传粉昆虫以及防御害虫等, 因此这些物质主要集中释放在菊花易感虫的幼嫩叶片组织和开花的子房部位, 这些物质的释放可能与相应的单萜以及倍半萜类合成酶的调控表达相关。通过基因表达分析发现, 合成倍半萜的菊花 *CmFDS* 基因家族成员 *CmFDS1* 和 *CmFDS2* 以及本研究克隆得到的法尼醇合成酶基因 *CmFAS* 均在幼嫩组织和子房中表达较高。这表明, 通过不同基因的时空调控可以有效地实现不同代谢产物的特定合成和释放, 而这些代谢产物的不同组成也为菊花在药用和茶用等功效以及香味与抗性观赏价值中发挥了一定的作用。本研究中从基因表达模式以及体外酶反应对 *CmFAS* 的功能进行了初步验证, 但其在植物体内的产物特征以及生态效应还有待进一步研究。前人研究报道 *CmFAS* 的产物法尼醇、菊基醇也具备抑制昆虫取食、影响刺吸行为等作用 (Guti et al., 1997; Dudareva & Pichersky, 2008; Hu et al., 2018)。*CmFAS* 的克隆与功能研究不仅加深了对菊科植物倍半萜合成酶家族基因结构和功能相关性的认识, 同时也为利用代谢工程手段调控菊花次生代谢组成从而改善菊花抗虫性提供了新的途径。

References

- Aharoni A, Giri A P, Deurlein S, Griepink F, de Kogel W J, Verstappen F W, Verhoeven H A, Jongsma M A, Schwab W, Bouwmeester H J. 2003. Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Cell*, 15 (12): 2866 - 2884.
- Aharoni A, Giri A P, Verstappen F W A, Berteaux C M, Sevenier R, Sun Z K, Jongsma M A, Schwab W, Bouwmeester H J. 2004. Gain and loss of fruit flavor compounds produced by wild and cultivated strawberry species. *Plant Cell*, 16 (11): 3110 - 3131.
- Barkman T J, Martins T R, Sutton E, Stout J T. 2007. Positive selection for single amino acid change promotes substrate discrimination of a plant volatile producing enzyme. *Molecular Biology Evolution*, 24 (6): 1320 - 1329.
- Bleeker P M, Mirabella R, Diergaarde P J, Vandoorn A, Tissier A, Kant M R, Prins M, de Vos M, Haring M A, Schuurink R C. 2012. Improved herbivore resistance in cultivated tomato with the sesquiterpene biosynthetic pathway from a wild relative. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 109 (49): 20124 - 20129.
- Chen F, Tholl D, D'Auria J C, Farooq A, Pichersky E, Gershenzon J. 2003. Biosynthesis and emission of terpenoid volatiles from *Arabidopsis* flowers. *Plant Cell*, 15 (2): 481 - 494.
- Davidovich-Rikanati R, Lewinsohn E, Bar E, Iijima Y, Pichersky E, Sitrit Y. 2008. Overexpression of the lemon basil alpha-zingiberene synthase gene increases both mono- and sesquiterpene contents in tomato fruit. *Plant Journal*, 56 (2): 228 - 238.
- Dudareva N, Pichersky E. 2008. Metabolic engineering of plant volatiles. *Current Opinion in Biotechnology*, 19 (2): 181 - 189.
- Guti E Rrez C, Fereres A, Reina M I A, Cabrera R, Gonz A Lez-Coloma A. 1997. Behavioral and sublethal effects of structurally related lower terpenes on *Myzus persicae*. *Journal of Chemical Ecology*, 23 (6): 1641 - 1650.
- Halbert S E, Corsini D, Wiebe M, Vaughn S F. 2009. Plant-derived compounds and extracts with potential as aphid repellents. *Annals of Applied Biology*, 154 (2): 303 - 307.
- Hemmerlin A, Rivera S B, Erickson H K, Poulter C D. 2003. Enzymes encoded by the farnesyl diphosphate synthase gene family in the big sagebrush *Artemisia tridentata* ssp. *spiciformis*. *Journal of Biological Chemistry*, 278 (34): 32132 - 32140.
- Holstein S A, Hohl R J. 2003. Monoterpene regulation of Ras and Ras-related protein expression. *The Journal of Lipid Research*, 44: 1209 - 1215.
- Hosfield D J, Zhang Y M, Dougan D R, Broun A, Tari L W, Swanson R V, Finn J. 2004. Structural basis for bisphosphonate-mediated inhibition of isoprenoid biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (10): 8526 - 8529.
- Hu H, Li J, Delatte T, Vervoort J, Gao L, Verstappen F, Xiong W, Gan J, Jongsma M, Wang C. 2018. Modification of chrysanthemum odour

- and taste with chrysanthemol synthase induces strong dual resistance against cotton aphids. *Plant Biotechnology Journal*, 16 (8): 1434 - 1445.
- Hughes A L, Ota T, Nei M. 1990. Positive Darwinian selection promotes charge profile diversity in the antigen-binding cleft of class-I major-histocompatibility-complex molecules. *Molecular Biology and Evolution*, 7 (6): 515 - 524.
- Li Xiaoying, Wu Junkai, Wang Haijing, Zhang Hongxia, Guo Xuemin. 2019. Analysis of volatile components in whorl tepals of *Magnolia denudata* 'Feihuang' during its development. *Acta Horticulturae Sinica*, 46 (10): 2009 - 2020. (in chinese)
- 李晓颖, 武军凯, 王海静, 张红霞, 郭学民. 2019. '飞黄' 玉兰花发育期各轮花被片挥发性成分分析. *园艺学报*, 46 (10): 2009 - 2020.
- Liu P, Wan J, Guo Y, Ge S, Rao G. 2012. Adaptive evolution of the chrysanthemyl diphosphate synthase gene involved in irregular monoterpene metabolism. *BMC Evolutionary Biology*, 12 (1): 214.
- Loza-Tavera H. 1999. Monoterpenes in essential oils: biosynthesis and properties. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 464: 49 - 62.
- Luo C, Chen D, Cheng X, Liu H, Li Y, Huang C L. 2018. SSR analysis of genetic relationship and classification in chrysanthemum germplasm collection. *Horticultural Plant Journal*, 4 (2): 73 - 82.
- Mcgarvey D J, Croteau R. 1995. Terpenoid metabolism. *Plant Cell*, 7 (7): 1015 - 1026.
- Nagegowda D A, Gutensohn M, Wilkerson C G, Dudareva N. 2008. Two nearly identical terpene synthases catalyze the formation of nerolidol and linalool in snapdragon flowers. *Plant Journal*, 55 (2): 224 - 239.
- Phillips M A, D'Auria J C, Gershenzon J, Pichersky E. 2008. The *Arabidopsis thaliana* type I isopentenyl diphosphate isomerase are targeted to multiple subcellular compartments and gave overlapping functions in isoprenoid biosynthesis. *Plant Cell*, 20 (3): 677 - 696.
- Pickett J A, Allemann R K, Birkett M A. 2013. The semiochemistry of aphids. *Natural Product Reports*, 30 (10): 1277 - 1283.
- Pupko T, Sharan R, Hasegawa M, Shamir R, Graur D. 2003. Detecting excess radical replacements in phylogenetic trees. *Gene*, 319 (1): 127 - 135.
- Rondeau J M, Bitsch F, Bourgier E, Geiser M, Hemmig R, Kroemer M, Lehmann S, Ramage P, Rieffel S, Strauss A, Green J R, Jahnke W. 2006. Structural basis for the exceptional in vivo efficacy of bisphosphonate drugs. *ChemMedChem*, 1 (2): 267 - 273.
- Sacchettini J C, Poulter C D. 1997. Biochemistry - Creating isoprenoid diversity. *Science*, 277 (5333): 1788 - 1789.
- Sallaud C, Rontein D, Onillon S, Jabes F, Duffe P, Giacalone C, Thoraval S, Escoffier C, Herbette G, Leonhardt N, Causse M, Tissier A. 2009. A novel pathway for sesquiterpene biosynthesis from Z, Z-farnesyl pyrophosphate in the wild tomato *Solanum habrochaites*. *Plant Cell*, 21 (1): 301 - 317.
- Schillmiller A L, Schauvinhold I, Larson M, Xu R, Charbonneau A L, Schmidt A, Wilkerson C, Last R L, Pichersky E. 2009. Monoterpenes in the glandular trichomes of tomato are synthesized from a neryl diphosphate precursor rather than geranyl diphosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 106 (26): 10865 - 10870.
- Steele C L, Crock J, Bohlmann J, Croteau R. 1998. Sesquiterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*) - Comparison of constitutive and wound-induced activities, and CDNA isolation, characterization and bacterial expression of delta-selinene synthase and gamma-humulene synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 273 (4): 2078 - 2089.
- Tholl D. 2006. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, 9 (3): 297 - 304.
- Wang K, Ohnuma S. 1999. Chain-length determination mechanism of isoprenyl diphosphate synthases and implications for molecular evolution. *Trends in Biochemical Sciences*, 24 (11): 445 - 451.
- Yang T, Gao L, Hu H, Stoopan G, Wang C, Jongsma M A. 2014. Chrysanthemyl diphosphate synthase operates in planta as a bifunctional enzyme with chrysanthemol synthase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 289 (52): 36325 - 36335.
- Yu X, Jones H D, Ma Y, Wang G, Xu Z, Zhang B, Zhang Y, Ren G, Pickett J A, Xia L. 2012. (E)- β -Farnesene synthase genes affect aphid (*Myzus persicae*) infestation in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Functional & Integrative Genomics*, 12 (1): 207 - 213.
- Yue Yue-chong, Fan Yan-ping. 2011. The terpene synthases and regulation of terpene metabolism in plants. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (2): 379 - 388. (in Chinese)
- 岳跃冲, 范燕萍. 2011. 植物萜类合成酶及其代谢调控的研究进展. *园艺学报*, 38 (2): 379 - 388.
- Zhang J, Zhang Y, Rosenberg H F. 2002. Adaptive evolution of a duplicated pancreatic ribonuclease gene in a leaf-eating monkey. *Nature Genet*, 30 (4): 411 - 415.